

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-186884

(P2001-186884A)

(43)公開日 平成13年7月10日(2001.7.10)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 N 15/09
1/21
9/10
// (C 12 N 1/21
C 12 R 1:625)

識別記号
Z N A

F I
C 12 N 1/21
9/10
(C 12 N 1/21
C 12 R 1:625)
(C 12 N 9/10

テマコード*(参考)
4 B 0 2 4
4 B 0 5 0
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 16 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号

特願平11-350319

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(22)出願日 平成11年12月9日(1999.12.9)

(72)発明者 田口 精一

埼玉県川越市脇田本町31-16 グリーンブ

ラザ201号

(31)優先権主張番号 特願平11-295649

(72)発明者 百瀬 春生

神奈川県鎌倉市玉綱2-24-2

(32)優先日 平成11年10月18日(1999.10.18)

(74)代理人 100059959

弁理士 中村 稔 (外9名)

(33)優先権主張国 日本 (J P)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 微生物由来トランスクルタミナーゼの製造法

(57)【要約】

【課題】本発明は、ストレプトマイセス属細菌にトランスクルタミナーゼを多量に分泌生産させることによって、トランスクルタミナーゼを多量に製造する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、放線菌由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子およびその本来の(天然の)プロモーターを含む発現プラスミドを有するストレプトマイセス属細菌を培養することにより、培養初期から中期にはプロトトランスクルタミナーゼを分泌させ、培養後期にはストレプトマイセス属細菌に由来するプロテアーゼ等でプロ構造体を切断除去することにより成熟型(活性型)のトランスクルタミナーゼを取得することを特徴とする、トランスクルタミナーゼの多量製造方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 放線菌由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子配列及び当該トランスクルタミナーゼ遺伝子の発現を制御しているプロモーター配列を含む遺伝子構築物を導入したストレプトマイセス属細菌。

【請求項2】 放線菌がストレプトバーチシリウム・シナモニウムである請求項1に記載のストレプトマイセス属細菌。

【請求項3】 ストレプトマイセス・リビダンスである請求項1または2に記載のストレプトマイセス属細菌。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載のストレプトマイセス属細菌を培養し、放線菌由来のプロトランスクルタミナーゼを培地中に分泌させることを特徴とする、プロトランスクルタミナーゼの製造法。

【請求項5】 請求項1～3のいずれか1項に記載のストレプトマイセス属細菌を培養し、放線菌由来のプロトランスクルタミナーゼを培地中に分泌させ、前記ストレプトマイセス属細菌由来のプロテアーゼによって前記プロトランスクルタミナーゼのプロ構造部を切断除去し、放線菌由来の成熟型トランスクルタミナーゼを回収することを特徴とする、成熟型トランスクルタミナーゼの製造法。

【請求項6】 プロトランスクルタミナーゼが配列番号2の33番目のグリシン残基から416番目のプロリン残基に至るアミノ酸配列を有する、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 成熟型トランスクルタミナーゼが配列番号2の87番目のセリン残基から416番目のプロリン残基に至るアミノ酸配列を有する、請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*)の宿主-ペクター系を用いて、遺伝子組換え法により放線菌由来のトランスクルタミナーゼを分泌生産する方法に関するものである。本発明によって分泌生産されるトランスクルタミナーゼは食品加工や医薬等に幅広く利用されている。

【0002】

【従来の技術】 本発明によって分泌生産されるトランスクルタミナーゼはタンパク質のペプチド鎖内にあるγ-カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。本酵素をタンパク質に作用させると、ε-(γ-Glu)-Lys 架橋形成反応、Glnの脱アミド化によるGluへの置換反応が起こりうる。このトランスクルタミナーゼは、ゼリー等のゲル化食品、ヨーグルト、チーズ、あるいはゲル状化粧品などの製造や食肉の肉質改善等に利用されている(特公平1-50382)。また、熱に安定なマイクロカプセルの素材、固定化酵素の担体などの製造に利用されているなど、産業上利用性の高い酵素である。

【0003】 トランスクルタミナーゼはこれまでに動物由来のものと微生物由来のもの(マイクローピアルトランスクルタミナーゼ:以下「MTG」という)が知られている。前者は、カルシウムイオン依存性の酵素で、動物の臓器、皮膚、血液などに分布している。例えば、モルモット肝臓トランスクルタミナーゼ(K. Ikura et al. *Biochemistry* 27 2898(1988))、ヒト表皮ケラチン細胞トランスクルタミナーゼ(M. A. Phillips et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 9333(1990))、ヒト血液凝固因子XIII(A. Ichinose et al. *Biochemistry* 25 6900(1990))などがある。後者については、ストレプトバーチシリウム属の菌から、カルシウム非依存性のものが発見されている。例えば、ストレプトバーチシリウム・グリセオカルネウム(*Streptoverticillium griseo carneum*) IF0 12776、ストレプトバーチシリウム・シナモニウム(*Streptoverticillium cinnamoneum* sub s p. *cinnamoneum*) IF0 12852、ストレプトバーチシリウム・モバラエンス(*Streptoverticillium mobaraense*) IF0 13819等があげられている(特開昭64-27471)。これらの微生物が生産するトランスクルタミナーゼの一次構造はペプチドマッピング及び遺伝子構造解析の結果、動物由来のものとは相同性を全く持たないことが判明している(ヨーロッパ特許公開公報0 481 504 A 1)。

【0004】 微生物由来トランスクルタミナーゼ(MTG)は、上記菌類等の培養物から精製操作をへて製造されているため、供給量、効率等の点で問題があった。また、遺伝子工学的手法によるトランスクルタミナーゼの製造も試みられている。トランスクルタミナーゼタンパク質およびその遺伝子については例えば、特開昭64-27471、*Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 82-87(1994)、*Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 88-92(1994)、特開平5-199883、*Biochimie*, 80, 313-319(1998)、*Eur. J. Biochem.*, 257, 570-576(1998), WO 9606931、WO 9622366などに報告されており、これらには例えば*Streptomyces lividans*、*Aspergillus oryzae*、*E. coli*等の宿主-ペクター系での発現生産に関する報告がなされている。また、大腸菌(*E. coli*)、酵母等の微生物における分泌発現(特開平5-199883)による方法と*E. coli*でMTGを不活性融合タンパク質封入体として発現させた後、この封入体をタンパク質変性剤で可溶化し、脱変性剤処理を経て再生されることにより活性をもつMTGを生産する方法(特開平6-30771)が報告されている。しかしながら、従来の方法による微生物による分泌発現においては、その発現量が非常に少ないという問題点が指摘される。ストレプトマイセスにおけるトランスクルタミナーゼの分泌生産に関しては、具体的な分泌蓄積量の記載がある例として、ストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*)を宿主とする遺伝子組換え法でストレプトバーチシリウム・モバラエンス(*Streptoverticillium mob*

araense) 由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子を導入した報告があるが、その分泌量は0.1mg/l程度でしかない(Biosci.Biotech.Biochem., 58, 82-87(1994); 特開平5-199883)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ストレプトマイセス属細菌にトランスクルタミナーゼを多量に分泌生産させることによって、トランスクルタミナーゼを多量に製造する方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の方法は、放線菌ストレプトマイセスの宿主-ベクター系を用いて、放線菌由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子、すなわちシグナルペプチド領域とプロ構造領域および成熟体構造領域、並びに当該トランスクルタミナーゼ遺伝子の発現を制御するその本来の(天然の)プロモーター領域を用いて、ストレプトマイセス属細菌内で高発現可能な発現型プラスミドを構築し、この発現型プラスミドをストレプトマイセス属細菌に導入し、培養することにより、培養初期から中期にはプロ構造部の付加したトランスクルタミナーゼ(プロトランスクルタミナーゼ)を分泌させ、培養後期にはプロ構造体をストレプトマイセス属細菌に由来するプロテアーゼ等で切斷除去することにより成熟型(活性型)のトランスクルタミナーゼを取得することを特徴とする、トランスクルタミナーゼの多量製造方法である。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の方法により、ストレプトマイセス属細菌が宿主-ベクター系として用いられ、トランスクルタミナーゼ遺伝子の本来のプロモーターの下流にプロ構造部を含むトランスクルタミナーゼ(プロトランスクルタミナーゼ)遺伝子を結合した発現構築物が作製され、これがストレプトマイセス属細菌中に導入され、発現され、菌体外に分泌されたプロトランスクルタミナーゼが更にそのストレプトマイセス属自身が生産するプロテアーゼ等によって切斷除去されることにより、成熟型(活性型)のトランスクルタミナーゼが多量に得られる。

【0008】分泌型タンパク質は一般にはプレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳され、その後、翻訳後修飾を受けて成熟型タンパク質になることが知られている。すなわち、一般に、プレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳された後、シグナルペプチド(「フレ部分」)が切斷されて成熟ペプチドまたはプロペプチドに変換され、プロペプチドはプロテアーゼによってさらにプロ部分が切斷されて成熟型ペプチドになることが知られている。トランスクルタミナーゼはそのようなタンパク質の一つである。本明細書において、シグナルペプチドおよびプロ部分の両方を有するトランスクルタミナーゼ、すなわち、一次翻訳産物を「プレプロトランス

グルタミナーゼ」と称することがあり、またシグナルペプチドを有しないがプロ部分を有するトランスクルタミナーゼを「プロトランスクルタミナーゼ」と称することがある。プロトランスクルタミナーゼのプロ部分は「プロ構造部」または単に「プロ構造」と称することもあり、本明細書においてトランスクルタミナーゼの「プロ構造部/プロ構造」とタンパク質の「プロ部分」とは互換的に使用される。従って、「プロトランスクルタミナーゼ」は「プロ構造部を付加したトランスクルタミナーゼ」とも称される。

【0009】本明細書においてプロ部分を「切斷除去」したタンパク質とは、ペプチド結合を切斷することによってプロ部分を構成する少なくとも1以上のアミノ酸を除去したタンパク質をいい、そのN末端領域が天然の成熟型タンパク質のものと完全に一致するタンパク質、および、そのタンパク質の活性を有する限り、天然のタンパク質に比較してN末端にプロ部分に由来する1以上の余分のアミノ酸を有するものおよび天然の成熟型タンパク質よりもアミノ酸配列が短いタンパク質も含まれる。また、本明細書において「成熟型トランスクルタミナーゼ」と「活性型トランスクルタミナーゼ」は同じ意味で使用される。

【0010】本発明に使用される遺伝子構築物は、一般にプロモーター、プレプロトランスクルタミナーゼをコードする核酸断片、およびストレプトマイセス属細菌中で目的タンパク質遺伝子を発現させるために必要な制御配列を含む適切な配列を適切な位置に有するものである。この構築物のために使用できるベクターは特に制限されず、ストレプトマイセス属細菌中で機能し得るものであればよく、プラスミドのように染色体外で自律増殖するものであっても細菌染色体に組み込まれるものであってもよい。ストレプトマイセス属細菌由来のプラスミドが好ましく、そのようなプラスミドとしては、例えばpIJ702(J.Gen.Microbiol., 129, 2703-2714, (1983))、及びこれらを改良したプラスミド等が挙げられる。

【0011】本発明の方法において、ストレプトマイセス属細菌でトランスクルタミナーゼ遺伝子を発現させるために利用できるプロモーターは放線菌のトランスクルタミナーゼ遺伝子の本来のプロモーターである。ただし、放線菌においては、Escherichia coliにおけるようにプロモーターのコンセンサス配列は明確になっておらず、プロモーター領域が必ずしも特定できない場合がある。このような場合、トランスクルタミナーゼの構造遺伝子及びその発現を制御するプロモーター領域を含むのに十分な長さの5'上流域を包含する遺伝子断片を利用すればよい。本発明において利用できるトランスクルタミナーゼ遺伝子は特に限定されないが、ストレプトバーチシリウム・シナモニウム(Streptovorticillium cinnamomeum) IF0 12852、ストレプトバーチシリウム・グリセオカルニウム(Streptovorticillium griseocarneum) I

IFO 12776、ストレプトバーチシリウム・モバラエンス (*Streptoverticillium moharaense*) IFO 13819、ストレプトマイセス・リディカス (*Streptomyces lydicus*) (W 096-06931) 等の放線菌由来の分泌型トランスクルタミナーゼ遺伝子が好ましい。ストレプトバーチシリウム・シナモニウムまたはストレプトバーチシリウム・モバラエンス由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子が特に好ましく、それらのトランスクルタミナーゼ遺伝子の本来の(天然の)プロモーターと共に使用される。配列表配列番号1に本発明者らが決定した *Streptoverticillium cinnamoneum* IFO 12852 由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子の5'上流域を一部含む全塩基配列を、および、配列番号2に該塩基配列にコードされるアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列の1番目から32番目までがプレ部分の配列、33番目から86番目までがプロ部分の配列、87番目から416番目までが成熟型トランスクルタミナーゼの配列であると推定される。また、配列表配列番号3に *Streptoverticillium moharaense* IFO 13819 由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子の5'上流域の一部を含む全塩基配列を、および、配列番号4に該配列にコードされるアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列の1番目から31番目までがプレ部分の配列、32番目から76番目までがプロ部分の配列、77番目から407番目までが成熟型トランスクルタミナーゼの配列である。

【0012】本発明に使用される遺伝子構築物のストレプトマイセス属細菌への導入方法は特に限定されず、通常よく用いられるプロトプラス法(Gene, 39, 281-286 (1985); 特開平3-251182)、エレクトロポーレーション法(Bio/Technology, 7, 1067-1070(1989))等の方法を用いれば良い。また得られた形質転換体は通常よく用いられている方法や条件に従って培養すればよい。例えば、上記微生物を培養するための培地としては通常の炭素源、窒素源、無機イオンを含有する通常の培地でよい。さらに高い増殖性を得るためににはビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素やポリペプトン、酵母エキス等の天然素材を添加する事が望ましい。炭素源としては、可溶性デンプン、グルコースやシクロース等の炭水化物、有機酸、アルコール類、その他が適宜使用される。培養は好気条件下にpH 5.0から8.5、温度を15°Cから37°Cの適当な範囲に制御しつつ、1日ないし2週間程度培養を行う。

【0013】窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が用いられる。無機イオンとしては、マグネシウムイオン、磷酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン、その他が必要に応じ適宜使用される。そのような条件下で形質転換体を培養することにより、プレプロトランスクルタミナーゼが菌体内で大量に生産され、プロトランスクルタミナーゼとして菌体外に分泌され、その後、ストレプトマイセス属細菌自身がこの培養条件下で分泌生産するプロテアーゼによって

培地中で切断され、成熟型(活性型)トランスクルタミナーゼが多量に培養液中に蓄積する。本発明により分泌生産されたトランスクルタミナーゼはそれぞれの特性に応じ、当業者によく知られた方法に従って、培養後の培地から分離精製することができる。例えば、菌体の遠心除去等を行った後、硫酸アンモニウムやエタノール沈殿をはじめ、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲルfiltration 等の適切な既知の方法により、またはこれらを組み合わせることにより分離、精製すれば良い。

【0014】

【実施例】実施例1. *Streptoverticillium cinnamoneum* IFO 12852のトランスクルタミナーゼ遺伝子の取得

ストレプトバーチシリウム・シナモニウム (*Streptoverticillium cinnamoneum*) CBS683.68のトランスクルタミナーゼ遺伝子の配列は既に決定されている(Biochimie., 80, 313-319(1998))。この配列を参考にして、配列番号5と配列番号6に示したプライマーを合成し、齊藤、三浦の方法(Biochem. Biophys. Act., 72, 619(1963))により調製した *Streptoverticillium cinnamoneum* IFO 12852の染色体DNAから成熟トランスクルタミナーゼ配列をコードする領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を用い、反応条件はこれのプロトコールに従った。

(配列番号5) 5'-TCCGATGACCGGGAAACTCCTCCGCCGAG-3'
(配列番号6) 5'-CGGCCAGCCTGCTCCACCTTGGCGGGGC-3'

【配列表フリーテキスト】

配列番号5:ストレプトバーチシリウム・シナモニウム由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子増幅用PCRプライマー

配列番号6:ストレプトバーチシリウム・シナモニウム由来のトランスクルタミナーゼ遺伝子増幅用PCRプライマー

【0015】次に増幅した約960bpのDNA断片を、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2(宝酒造社製)と[α -32P]dCTPを用いて、添付のプロトコールに従って反応させ、DNAプローブを作製した。作製したプローブと *Streptoverticillium cinnamoneum* IFO 12852の染色体DNAを用いて、Molecular Cloning 第2版(J. Sambrook E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9.31(1989))に記載されているような一般的な方法に従って、ササンプロットハイブリダイゼーションを行ったところ、制限酵素BamHIで切り出される約3.5kbの断片にトランスクルタミナーゼ遺伝子が存在していることが確認できた。そこで *Streptoverticillium cinnamoneum* IFO 12852の染色体DNAをBamHIで消化した約3.5kbの断片をEASYTRAP Ver.2(宝酒造社製)を用いてアガローズゲル電気泳動により回収し、これをpUC18のBamHI部位に挿入した後、Escherichia coli JM1

09(宝酒造社製)のコンビテントセルに導入し、ライブラリーを作製した。先に作製したトランスクルタミナーゼのDNAプローブを用いて、Molecular Cloning 第2版 (J. Sambrook E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.90(1989)) に記載されるような一般的手順に従ったコロニーハイブリダイゼーションにより、ライブラリーのスクリーニングを行い、トランスクルタミナーゼ遺伝子断片がクローニングされたプラスミドを保持する菌株を取得し、これよりプラスミドを回収し、pB3.5と名付けた。

【0016】pB3.5にクローニングされている断片の塩基配列を決定したところ、*Streptoverticillium cinnamoneum* IF0 12852のトランスクルタミナーゼ遺伝子は、*Streptoverticillium cinnamoneum* CBS683.68のトランスクルタミナーゼ遺伝子とほぼ同じ塩基配列を有することが確認された。またトランスクルタミナーゼ遺伝子はpUC18のマルチクローニングサイトのEcoRIからHindIIIの方向に転写されるように挿入されている。塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット (PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシーケンサー373A (PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。決定された塩基配列と該塩基配列にコードされるアミノ酸配列をそれぞれ配列表配列番号1および2に示す。アミノ酸配列の1番目から32番目までがプレ部分の配列、33番目から86番目までがプロ部分の配列、87番目から416番目までが成熟型トランスクルタミナーゼの配列であると推定される。

【0017】実施例2. トランスクルタミナーゼ遺伝子発現用プラスミドの構築

プラスミドベクター(pIJ702)の取得

pIJ702の調製は[J.Bacteriol., 162, 406-412(1985); J.Bacteriol., 169, 1929-1937(1987)]に従い行った。具体的にはストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*) 66をpIJ702で形質転換した*Streptomyces lividans* 3131(ATCC 35287)(J.Gen.Microbiol., 129, 2703-2714(1983))を以下の培地条件で30°C、2日間培養した。[YEME培地+0.5%グリシン+50μg/mlチオストレプトン] 3% イースト・エキストラクト

5% ベプトン

3% マルト・エキストラクト

1% 塩化マグネシウム

0% グルコース

34. 0% サッカロース

5% グリシン

1% 50mg/mlチオストレプトン溶液

(シグマ:ジメチルスルホキシド溶液) (pH7.0)

【0018】上記条件下で培養した培養培地200mlを遠心分離(12,000g, 4°C, 10分間)し、50mM Tris-HCl (pH8.0)-5mM EDTA-50mM NaClで洗浄後、得られた菌体を50mM Tris-HCl (pH8.0)-10mM EDTA-25% Sucrose (以下「T

E-Sucrose」という。) 10mlに懸濁した。次に30mg/mlのリゾチーム(シグマ)を含むTE-Sucrose 2mlおよび0.25M EDTA 4mlを加え、37°Cで30分間インキュベート後、20% SDS 2mlを加え、さらに5M NaCl 5mlを加えて穏やかに攪拌した後、0°Cで1晩インキュベートした。次に遠心分離(100,000g, 4°C, 40分間)により得られた上清に30%ポリエチレン6000を終濃度10%になるように加え、0°Cで4.5時間インキュベートした。その後、遠心分離(900g, 4°C, 5分間)し、沈殿を10mM Tris-HCl (pH8.0)-1mM EDTA-50mM NaClに溶かした。次に、塩化セシウム16.8gおよび10mg/mlの濃度にエチジウムプロマイドを10mM Tris-HCl (pH8.0)-1mM EDTA(以下「TE」という。)に溶かし調製した溶液1.2mlを加え、遠心分離(1,300g, 室温, 15分間)により、残さを取り除いた後、遠心分離(230,000g, 20°C, 12時間)を行った。遠心後、紫外線照射下でプラスミドDNA層を分離抽出し、TEで飽和したブタノールによる抽出操作を3回繰り返し行いエチジウムプロマイドを除いた。さらにTEで4°Cで1晩透析した後、TE飽和フェノールで1回、クロロホルム・イソアミルアルコールで2回の抽出操作を行い、水層を回収した。次に1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)溶液と2倍容量のエタノールを加え、-80°Cに30分間静置し、遠心分離(12,000g, 4°C, 15分間)により沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、乾燥し、TE200μlに溶かした。約10μgのプラスミドDNAが得られた。

【0019】2) 発現用プラスミド構築

まず、放線菌*Streptomyces*と大腸菌(*Escherichia coli*)の両方の宿主で複製可能なシャトルベクターを作製した。放線菌多コピープラスミドのpIJ702(約5.8kb)をSacIとPstIで切断し、mel(チロシナーゼ遺伝子)プロモーター領域を除去した5.1kbの大きい断片を調製した。次にプロテアーゼインヒビターSSI(*Streptomyces subtilisin inhibitor*)と抗菌ペプチド(アビデシン)遺伝子の融合体が組み込まれたpOSΔB-Ap1(約7.9kb) (Appl. Environ. Microbiol., 60, 3566-3572(1994))をHindIIIとPstIで切断し、約2kbの断片を調製した。さらに*Escherichia coli*の多コピー型プラスミドpUC18(宝酒造社製)をEcoRIで切断し、T4 DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)で平滑末端化してセルフライゲイションを行い、EcoRIで切断されないプラスミドを選択し、さらにSacIとHindIII切断した2.7kbの断片を調製した。

【0020】次にpIJ702のSacI-PstI 5.1kb断片とpOSΔB-Ap1のHindIII-PstI 2kb断片、およびpUC18のSacI-HindIII 2.7kb断片の3者ライゲイションを行い、シャトルベクターpUJS(約9.8kb)を構築した。さらにpUJSをHindIIIとEcoRI切断して大断片8.6kbを回収した。(1)でクローニングした*Streptoverticillium cinnamoneum* IF0 12852のトランスクルタミナーゼ遺伝子を搭載したpB3.5(約6.2kb)をHindIIIとEcoRIで切断し、3.5kbのHindIII-EcoRI断片を回収した。この3.5kbのHindIII-EcoRI断

片をpUJSのHindIIIとEcoRIサイトに挿入したpUJ-MTG (約12.1kb) を構築した。以上の構築手順を図1に示す。pUJ-MTGを形質転換して得られた形質転換体Escherichia coli AJ13669は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(受託番号FERM P-17602、寄託日平成11年10月14日)。

【0021】実施例3. Streptomyces lividans TK24への形質導入

Streptomyces lividans TK24はStreptomyces lividans 66に由来する株であり、ストレプトマイシン耐性が付与されている(GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES, A LABORATORY MANUAL: D.A. Hopwood et al., p266, 1985, The John Innes Foundation Norwich)。本菌株はD.A. Hopwood(John Innes Institute, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, U.K.)より提供されたものであり、D.A. Hopwood研究室より入手可能である。Streptomyces lividans TK24を[特開平3-251182、Hunter, I.S. "DNA Cloning" A

[P緩衝液]

TES[N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulphonic acid]	5.73g
サッカロース	103g
塩化マグネシウム	2.03g
硫酸カリウム	0.5g
塩化カルシウム	3.68g
微量元素溶液	2ml/L(pH7.4)

なお、1%リン酸1カリウム溶液を別調製し、使用直前に100ml P緩衝液当たり1mlを加えた。

【微量元素溶液】

1L中、以下のものを含む。

塩化亜鉛	40mg
塩化第二鉄	200mg
塩化第二銅	10mg

DNA溶液(0.2 μ g/ μ l)

Streptomyces lividans TK24のプロトプラスト懸濁液	20 μ l
0.35M サッカロース	100 μ l
20%ポリエチレングリコール1000を含むP緩衝液	20 μ l

を穏やかに混和し、室温で2分間静置する。遠心分離(1,700g、室温、10分間)し、ペレットを集め、P緩衝液で2回洗浄を繰り返し、P緩衝液1mlに懸濁した後に2

[R-2寒天培地]

1)R-2/A

硫酸カリウム	0.5g/l
塩化マグネシウム	20.2g/l
塩化カルシウム	5.9g/l
グルコース	20.0g/l
プロリン	6.0g/l
カザミノ酸	0.2g/l
微量元素溶液	4 ml
寒天	44.0g/l

2)R-2/B

TES

Practical Approach 2, Glover, D.M. (Ed.) IRL Press (1985)、GENETIC MANIPULATION OF STREPTOMYCES, A LABORATORY MANUAL: D.A. Hopwood et al., p104, 1985, The John Innes Foundation Norwich]の方法に従って、プロトプラスト化し形質導入した。具体的にはStreptomyces lividans TK24をYEME培地+0.5%グリシンで30°C、2日間培養した。培養液200mlを遠心分離(1,300g、室温、10分間)し、得られた菌体を0.35Mサッカロース72mlに懸濁した。次に、この懸濁液を遠心分離(1,300g、室温、10分間)し、菌体を1mg/mlのリゾチーム(シグマ)を含むP緩衝液60mlに再懸濁し、これを30°C、2.5時間インキュベートし、脱脂綿で濾過し、残さを取り除いた。得られた濾液を遠心分離(1,300g、室温、10分間)し、P緩衝液25mlで洗浄を2回繰り返した後、沈殿をP緩衝液1mlに懸濁し、プロトプラスト懸濁液とした。

【0022】

塩化マンガン	10mg
四硼酸ナトリウム	10mg
モリブデン酸アンモニウム	10mg

【0023】次に、トランスクルタミナーゼ遺伝子発現プラスミドpUJ-MTG(約12.1kb)のStreptomyces lividans TK24のプロトプラスト懸濁液への形質導入を以下のように行った。

DNA溶液(0.2 μ g/ μ l)	20 μ l
Streptomyces lividans TK24のプロトプラスト懸濁液	100 μ l
0.35M サッカロース	20 μ l
20%ポリエチレングリコール1000を含むP緩衝液	1.5ml

00 μ lずつを以下のR-2寒天培地に塗布した。

【0024】

11.5g/l

イースト・エキストラクト
サッカロース
3) 1% KH₂PO₄

10.0g/l
203 g/l (pH7.4)

1)2)3)をそれぞれ別調製し、プレート培地作製時にR-2/AおよびR-2/Bを混合し、さらに1% KH₂PO₄溶液を最終容量200ml当たり1mlの割合で混合した。

【0025】形質転換体が塗布されたR-2寒天培地を30°Cで18時間インキュベートした後、200μg/mlのチオストレブトンを含むP緩衝液1mlを加え、寒天の全表面を覆い、さらに30°Cで7日間インキュベートし、コロニーを得た。得られたコロニーからプラスミドを調製して目的のプラスミドが導入されていることを確認した。

【0026】実施例4、トランスグルタミナーゼ遺伝子の発現と分泌生産

形質転換体pUJ-MTG/Streptomyces lividans TK24をチオストレブトン10μg/mlを含むトリプトン・ソーヤ・プロス(DIFCO社製)液体培地4mlで30°C、3日間培養し、この1mlを100mlの上記液体培地(500ml容坂口フラスコ)にシードし、30°Cで2週間培養した。経時に培養液をサンプリングして、その培養上清液10μlをSDS-PAGEに供してから、特開平6-046855記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、Molecular Cloning第2版(J. Sambrook E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p18.60(1989))に記載されるような一般的な条件でウエスタンプロットを行った。その結果、培養7~10日目頃まではプロ構造部の付加したトランスグルタミナーゼ(プロトランスグルタミナーゼ)の分泌生産(約40~50mg/l)が認められ、さらに培養を継続するとプロトランスグルタミナーゼがプロセッシングを受けた成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有するトランスグルタミナーゼの

生成量が増大し、2週間目頃には約40~50mg/lの成熟型トランスグルタミナーゼが蓄積した。

【0027】プロ構造部の付加したトランスグルタミナーゼ(プロトランスグルタミナーゼの分泌生産量の多い時期の培養上清を用いて、SDS-PAGE後、PVDF膜にセミドライプロッティングした(「遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析」、東京化学同人(1993))。プロッティング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。プロトランスグルタミナーゼの部分を取り取り、プロテインシークエンサー(モデル476A、パーキンエルマー社製)でN末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、プロトランスグルタミナーゼのN末端アミノ酸配列の10アミノ酸配列(Gly-Asp-Gly-Glu-Glu-Lys-Gly-Ser-Tyr-Ala-)が確認された。このアミノ酸配列はBiochimie., 80, 313-319(1998)で示されたプロ領域の配列とは異なっており、実施例1で決定したアミノ酸配列(配列番号2)と一致した。

【0028】

【発明の効果】本発明により、ストレプトマイセス属細菌にトランスグルタミナーゼを生産させ、培養液中にトランスグルタミナーゼを多量に得ることができる。本発明の方法によって培養液中に蓄積するトランスグルタミナーゼは、ストレプトマイセス属細菌自身によって生産されるプロテーゼによって切断された成熟型トランスグルタミナーゼであるため、簡便かつ大規模に培地から成熟型トランスグルタミナーゼを回収することができる。

【0029】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<;110>; Ajinomoto Co. Inc.
<;120>; A method of producing microbial transglutaminase
<;130>; Y1G806
<;140>;
<;141>;
<;150>; JP 11-295649
<;151>; 1999-10-18
<;160>; 6
<;170>; PatentIn Ver. 2.0
<;210>; 1
<;211>; 1461
<;212>; DNA
<;213>; Streptoverticillium cinnamoneum
<;220>;
<;221>; CDS
<;222>; (151)..(1398)
<;400>; 1

```

cggcggcagc cctccttgcc gccggcgagc cgacgcagga cggcgccggcc aaggccctga 60
 gcggcagctc gtcgcaaaacc cctccatcgc gtcgtgtct cacatgccct cgtttcacga 120
 gcgttaccca caaggagtt attgatttcc atg cac aaa cgt cgg aga ctt ctc 174
 Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu
 1 5
 gcc ttc gcc act gtg ggt gcg gtc ata tgc acc gca gga ttc aca cct 222
 Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro
 10 15 20
 tcg gtc agc cag gcc gcc agc agt ggc gat ggg gaa gag aag ggg tcc 270
 Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser
 25 30 35 40
 tac gcc gaa acg cac ggc ctg acg gcg gat gac gtc gag agc atc aac 318
 Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn
 45 50 55
 gca ctg aac gaa aga gct ctg act ctg ggc caa cct ggc aag cct ccg 366
 Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 60 65 70
 aag gaa tta cct ccg agc gcc agc gcg ccc tcc cgg gcc ccc tcc gat 414
 Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp
 75 80 85

 gac egg gaa act cct ccc gcc gag ccg ctc gac agg atg cct gag gcg 462
 Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala
 90 95 100
 tac cgg gcc tac gga ggc agg gcc act acg gtc gtc aac aac tac ata 510
 Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile
 105 110 115 120
 cgc aag tgg cag cag gtc tac agt cac cgc gac gga aag aaa cag caa 558
 Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln
 125 130 135
 atg acc gaa gag cag cga gaa aag ctg tcc tac ggt tgc gtt ggc gtc 606
 Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val
 140 145 150
 acc tgg gtc aac tcg ggc ccc tac ccg acg aac aga ttg gcg ttc gcg 654
 Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala
 155 160 165
 tcc ttc gac gag aac aag tac aag aac gac ctg aag aac acc agc ccc 702
 Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro
 170 175 180
 cga ccc gat gaa acg cgg gcg gag ttc gag ggt cgc atc gcc aag ggc 750
 Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly
 185 190 195 200
 agt ttc gac gag ggg aag ggt ttc aag cgg gcg cgt gat gtg gcg tcc 798
 Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser
 205 210 215
 gtc atg aac aag gcc ctg gaa aat gcc cac gac gag ggg act tac atc 846
 Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile
 220 225 230
 aac aac ctc aag acg gag ctc acg aac aac aat gac gct ctg ctc cgc 894
 Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg

235	240	245	
gag gac agc cgc tcg aac ttc tac tcg gcg ctg agg aac aca ccg tcc			942
Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser			
250	255	260	
ttc aag gaa agg gac ggc aac tac gac ccg tcc aag atg aag gcg			990
Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala			
265	270	275	280
gtg atc tac tcg aag cac ttc tgg agc ggg cag gac cag cgg ggc tcc			1038
Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser			
285	290	295	
tcc gac aag agg aag tac ggc gac ccg gaa gcc ttc cgc ccc gac cag			1086
Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln			
300	305	310	
ggt acc ggc ctg gtc gac atg tcg aag gac aga agc att ccg cgc agt			1134
Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser			
315	320	325	
ccg gcc aag ccc ggc gaa ggt tgg gtc aat ttc gac tac ggt tgg ttc			1182
Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe			
330	335	340	
ggg gct caa aca gaa gcg gat gcc gac aaa acc aca tgg acc cac ggc			1230
Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly			
345	350	355	360
gac cac tac cac gcg ccc aat agc gac ctg ggc ccc atg cac gta cac			1278
Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser Asp Leu Gly Pro Met His Val His			
365	370	375	
gag agc aag ttc cgg aag tgg tct gcc ggg tac gcg gac ttc gac cgc			1326
Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg			
380	385	390	
gga gcc tac gtg atc acg ttc ata ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc			1374
Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro			
395	400	405	
gcc aag gtg gag caa ggc tgg ccg tgacaggctg gtactacgac ctctgctgat			1428
Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro			
410	415		
ttctgccccgg tcagtccacg cctctcgacg cga			1461
<;210>; 2			
<;211>; 416			
<;212>; PRT			
<;213>; Streptoverticillium cinnamoneum			
<;400>; 2			
Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val			
1	5	10	15
Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser			
20	25	30	
Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr			
35	40	45	
Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr			
50	55	60	
Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser			
65	70	75	80

Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu
 85 90 95
 Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala
 100 105 110
 Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser
 115 120 125
 His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys
 130 135 140
 Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr
 145 150 155 160
 Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys
 165 170 175
 Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu
 180 185 190
 Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe
 195 200 205
 Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn
 210 215 220
 Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr
 225 230 235 240
 Asn Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr
 245 250 255
 Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn
 260 265 270
 Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp
 275 280 285
 Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp
 290 295 300
 Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser
 305 310 315 320
 Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp
 325 330 335
 Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala
 340 345 350
 Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser
 355 360 365
 Asp Leu Gly Pro Met His Val His Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser
 370 375 380
 Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile
 385 390 395 400
 Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro
 405 410 415
 <;210>; 3
 <;211>; 1809
 <;212>; DNA
 <;213>; Streptoverticillium mobaraense
 <;220>;
 <;221>; CDS
 <;222>; (578)..(1798)
 <;400>; 3

gtcgacgcgg gccgggaggg ggtgcggcgg cgcccttcgg ctgtgtggac gaagcgtcgg 60
 gtcggagggg cggccggata tcttccttgg ggccgggtgg ccggattgc cgccatggtg 120
 ttgcgggata atcgacccga agacatgatc acttctcgta tccacccat cacgtatccg 180
 ggagtcgaga agtgttacgc cgtccccctg tccgcgtcct caccctgtc gccgtgacag 240
 cgaccgcgt tcttccactc gcacggacgg cccacagga ccttcggcc cgggctcgcc 300
 ccggccgcctc ggtgacggcc tccgaataac gggccgcggc gggcctcgcc cggttgcacg 360
 atccgggtca cggccccccg cggccggcggc gccacgtccg gtctcgcccc gcccgcacatc 420
 ggctgcgact gccttcgctc gcacttc tccgcgtttt tccgcgcgg 480
 aaggtgcggc gacgcgtacc gaatccccct tcategcgac gtgcgtccgc acggccgcgt 540
 tcaacgtatc tccacgacaa aggagttgca gtttcc atg cgc ata cgc cgg aga 595
 Met Arg Ile Arg Arg Arg
 1 5
 gct ctc gtc ttc gcc act atg agt gct gtg tta tgc acc gcc gga ttc 643
 Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe
 10 15 20
 atg ccg tcg gcc ggc gag gcc gac aat ggc gct ggg gaa gag 691
 Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu
 25 30 35
 acg aag tcc tac gcc gaa acc tac cgc ctc acg gct gat gac gtc gct 739
 Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala
 40 45 50
 aac atc aac gct ctc aac gaa agc gct ccg gcc gct tcg agc gcc ggc 787
 Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly
 55 60 65 70
 ccg tcg ttc cgg gcc ccc gac tcc gac agg gtc acc cct ccc gcc 835
 Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala
 75 80 85
 gag ccg ctc gac agg atg ccc gac ccg tac cgt ccc tcg tac ggc agg 883
 Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg
 90 95 100
 gcc gag acg gtc aac aac tac ata cgc aag tgg cag cag gtc tac 931
 Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr
 105 110 115
 agc cac cgc gac ggc agg aag cag cag atg acc gag gag cag cgg gag 979
 Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu
 120 125 130
 tgg ctg tcc tac ggc tgc gtc ggt gtc acc tgg gtc aat tcg ggt cag 1027
 Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln
 135 140 145 150
 tac ccg acg aac aga ctg gcc ttc gct tcc gac gag gac agg ttc 1075
 Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe
 155 160 165
 aag aac gag ctg aag aac ggc agg ccc cgg tcc ggc gag acg cgg gag 1123
 Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala
 170 175 180
 gag ttc gag ggc cgc gtc gct aag gag agc ttc gac gag gag aag ggc 1171
 Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly
 185 190 195
 ttc cag cgg cgc cgt gag gtg gct atg aac agg gcc ctg gag 1219

Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu
 200 205 210
 aac gcc cac gac gag agc gct tac ctc gac aac ctc aag aag gaa ctg 1267
 Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu
 215 220 225 230
 gcg aac ggc aac gac gcc ctg cgc aac gag gac gcc cgt tcc ccg ttc 1315
 Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe
 235 240 245
 tac tcg gcg ctg cgg aac acg ccg tcc ttc aag gag cgg aac gga ggc 1363
 Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly
 250 255 260
 aat cac gac ccg tcc agg atg aag gcc gtc atc tac tcg aag cac ttc 1411
 Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe
 265 270 275
 tgg agc ggc cag gac cgg tcg agt tcg gcc gac aag agg aag tac ggc 1459
 Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly
 280 285 290
 gac ccg gac gcc ttc cgc ccc gcc ccg ggc acc ggc ctg gtc gac atg 1507
 Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met
 295 300 305 310
 tcg agg gac agg aac att ccg cgc agc ccc acc aac ccc ggt gag gga 1555
 Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly
 315 320 325
 ttc gtc aat ttc gac tac ggc tgg ttc ggc gcc cag acg gaa gcg gac 1603
 Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp
 330 335 340
 gcc gac aag acc gtc tgg acc cac gga aat cac tat cac gcg ccc aat 1651
 Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn
 345 350 355
 ggc agc ctg ggt gcc atg cat gtc tac gag agc aag ttc cgc aac tgg 1699
 Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp
 360 365 370
 tcc gag ggt tac tcg gac ttc gac cgc gga gcc tat gtg atc acc ttc 1747
 Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe
 375 380 385 390
 atc ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc gac aag gta aag cag ggc tgg 1795
 Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp
 395 400 405
 ccg tgatgtgagc g 1809
 Pro
 <;210>; 4
 <;211>; 407
 <;212>; PRT
 <;213>; Streptoverticillium mobaraense
 <;400>; 4
 Met Arg Ile Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp
 20 25 30
 Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

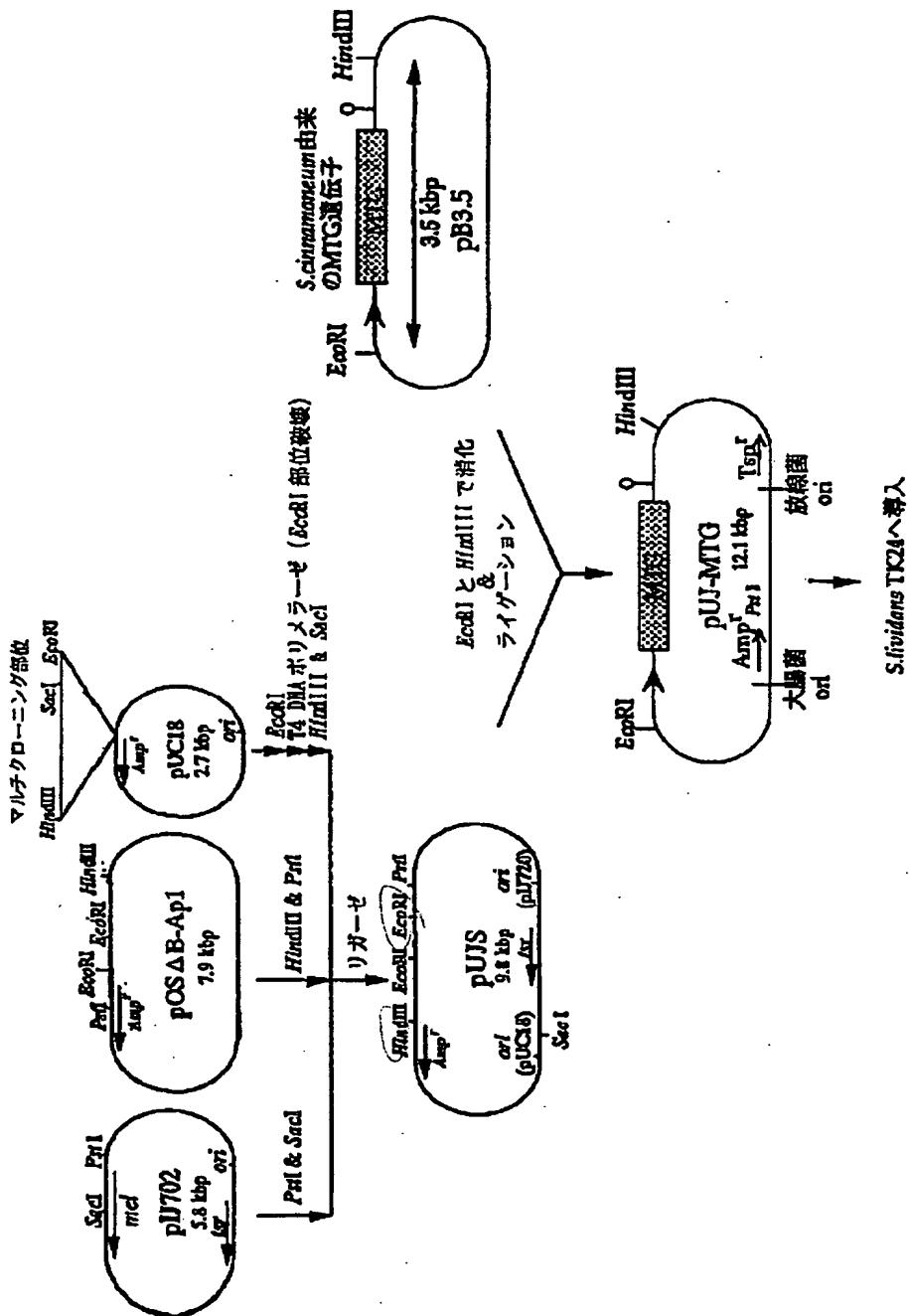
35	40	45
Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro		
50	55	60
Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp		
65	70	75
Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr		
85	90	95
Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg		
100	105	110
Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met		
115	120	125
Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr		
130	135	140
Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser		
145	150	155
Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg		
165	170	175
Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser		
180	185	190
Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val		
195	200	205
Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp		
210	215	220
Asn Leu Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu		
225	230	235
Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe		
245	250	255
Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val		
260	265	270
Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ala		
275	280	285
Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly		
290	295	300
Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro		
305	310	315
Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly		
325	330	335
Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn		
340	345	350
His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu		
355	360	365
Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly		
370	375	380
Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp		
385	390	395
Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro		
405		
<;210>; 5		
<;211>; 30		

<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:PCR primer for
amplification of transglutaminase gene from
S.cinnamoneum
<;400>; 5
tccgatgacc gggaaactcc tcccgccgag 30
<;210>; 6
<;211>; 30
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence:PCR primer for
amplification of transglutaminase gene from
S.cinnamoneum
<;400>; 6
cggccagcct tgcgtccaccc tggcgggggc 30

【図面の簡単な説明】

【図1】 発現用プラスミドpUJ-MTGの構築手順を示す。

〔図 1 〕



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷
(C 1 2 N 9/10
C 1 2 R 1:19)

識別記号

F I
C 1 2 R 1:19)
C 1 2 N 15/00

テーマコード（参考）

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA05 BA10 CA03 CA09
DA08 EA04 GA11 GA19 GA21
GA27 HA13 HA14 HA20
4B050 CC01 CC03 DD02 EE01 LL02
LL05
4B065 AA01Y AA50X AB01 AC14
AC15 BB01 BC01 BC03 BC26
BD50 CA29 CA41 CA50